

FCI / E P U U I U I 4 3 0

MODULARIO
I.C.A. - 101



Mod. C.E. - 1-4-7

09/914239

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

4



P00 / 1458

REC'D 20 JUN 2000	
WIPO	PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per INV. IND.

N. MI99 A 000396

534 PCT

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li 511 APR. 2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

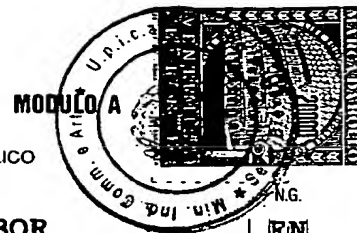
Ing. DI CARLO

Nicola Antonelli

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL MONTE TABOR EN
 Residenza Milano codice 03064280153
 2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altri cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.
 via Rossini n. 8 città Milano cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) C07K gruppo/sottogruppo 7/00

"Peptidi immunogenici derivati da MAGE-3 presentati da MHC di classe II e loro uso"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA ____/____/____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) Protti Maria Pia 3) _____
 2) Dellabona Paolo 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione tipo di priorità numero di domanda data di deposito allegato S/R

1) _____
 2) _____

SCIOGLIMENTO RISERVE
 Data N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 2 PROV n. pag. 27 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) ...
 Doc. 2) 2 PROV n. tav. 03 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) ...
 Doc. 3) 0 BS lettera d'incarico, produzione XXXXXXXXXXXX ...
 Doc. 4) 0 RIS designazione inventore ...
 Doc. 5) 0 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano ...
 Doc. 6) 0 RIS autorizzazione o atto di cessione ...
 Doc. 7) 0 nominativo completo del richiedente

SCIOGLIMENTO RISERVE
 Data N° Protocollo

8) attestati di versamento, totale lire Cinquecentosessantacinquemila# obbligatorio

COMPILATO IL 26/02/1999

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) Banfi Paolo

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

MILANO

codice 15

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI99A 000396

Reg. A.

L'anno millenovecento

NOVANTANOVE

, il giorno

VENTISEI

, del mese di

FEBBRAIO

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n.

00

fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

timbro
 dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE
CORTONESI MAURIZIO

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

M199A 00036

REG. A

DATA DI DEPOSITO

DATA DI RILASCIO

02/1999

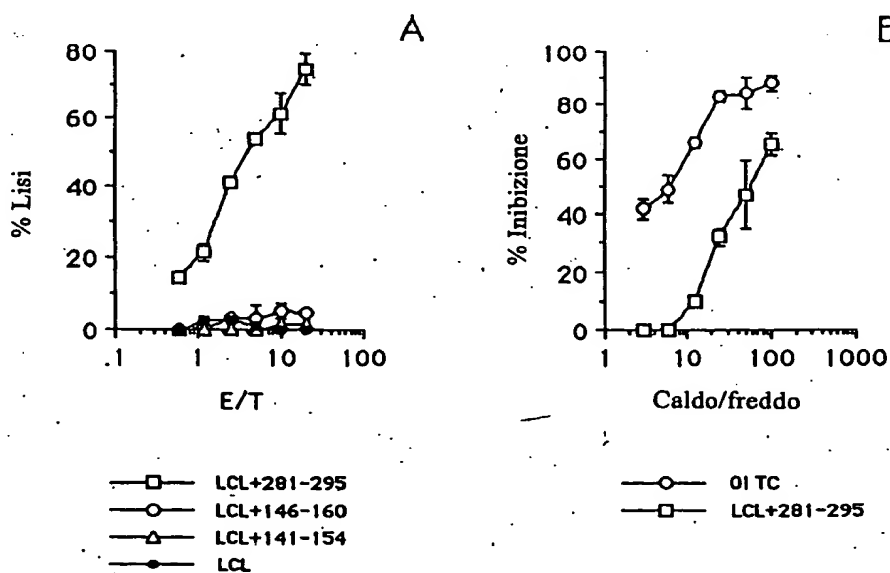
D. TITOLO

"Peptidi immunogenici derivati da MAGE-3 presentati da MHC di classe II e loro uso"

L. RIASSUNTO

Vengono descritti peptidi derivati dalla proteina MAGE-3, composizioni farmaceutiche che li contengono e il loro uso nella induzione della risposta immunitaria contro i tumori.

M. DISEGNO



741 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

26 FEB. 1999

E/as "PEPTIDI IMMUNOGENICI DERIVATI DA MAGE-3 PRESENTATI DA
MHC DI CLASSE II E LORO USO"

a nome: FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL MONTE TABOR

con sede in: Milano

MI 99 A 000396

* *

La presente invenzione si riferisce a peptidi derivati dalla proteina MAGE-3 ed al loro uso come immunostimolanti, specificamente come agenti in grado di stimolare la risposta mediata da linfociti T CD4⁺.

L'importanza dei linfociti CD4⁺ nella risposta immunitaria contro i tumori è stata chiaramente dimostrata in modelli animali. Le cellule T CD4⁺ hanno attività coadiuvante ("helper") nell'induzione e nel mantenimento delle cellule T anti-tumorali CD8⁺ (Greenberg, P.D., 1991, *Adv. Immunol.* 49:281-355; Chen, P., et al., 1993, *J. Immunol.* 151:244-255; Mandelboim, O., et al., 1995, *Nat. Med.* 1:1179-1183; Mayordomo, J.I., et al., 1995, *Nat. Med.* 1:1297-1302; Bellone, M., et al., 1997, *J. Immunol.* 158:783-789; Ostrand-Rosemberg, S., et al., 1990, *J. Immunol.* 144:4068-4071; James, R., et al., 1991, *Immunology* 72:213-218), ma possono anche avere una funzione effettrice sia con un meccanismo indiretto contro tumori MHC classe II-negativi, attraverso l'attivazione dei macrofagi, sia con un meccanismo diretto, contro tumori MHC classe II-positivi.

Recentemente è stata dimostrata la necessità dell'intervento di cellule CD4⁺ specifiche per lo stesso antigene tumorale, nell'induzione di linfociti citotossici (CTL) CD8⁺ con attività anti-tumorale (Ossendorp, F., et al. 1998. *J. Exp. Med.* 187:693-702). La dimostrazione del ruolo delle cellule T CD4⁺

nell'immunità anti-tumorale nell'uomo, deriva dallo studio di linfociti infiltranti i tumori, in cui è stato possibile rivelare la presenza di cellule T CD8⁺ e CD4⁺ nel tumore (Goedegebuure, P.S., et al. 1995. *Immunol. Res.* 14:119-131; Maccalli, C., et al. 1994. *Int. J. Cancer* 57:56-62), e dalla determinazione di anticorpi diretti contro antigeni tumorali nel siero di pazienti neoplastici (Sahin U. et al., 1997, *Curr. Opin. Immunol.* 9:709-716). Finora l'identificazione della risposta immunitaria mediata da cellule T contro i tumori, nell'uomo, e' stata indirizzata principalmente all'identificazione di risposte CTL CD8⁺ in associazione a molecole HLA di classe I. Per esempio, in WO 95/19783 sono descritti peptidi derivati da MAGE-3 in grado di legare molecole MHC di classe I come la classe HLA-A1. Normalmente, tali peptidi hanno dimensioni contenute tra gli 8 e i 10 residui amminoacidici.

L'unico antigene associato a melanoma finora dimostratosi bersaglio specifico per cellule T CD4⁺ reattive al melanoma, e del quale siano stati identificati epitopi per cellule T CD4⁺ (Topalian, S.L., et al. 1996. *J. Exp. Med.* 183:1965-1971), è l'antigene tirosinasi, espresso in melanociti normali e neoplastici (Topalian, S.L., et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9461-9465.; Yee, C., et al. 1996. *J. Immunol.* 157:4079-4086). WO 97/11669 (Topalian et al.) riporta che peptidi derivati da questo antigene vengono riconosciuti in associazione a molecole MHC di classe II.

La caratterizzazione del repertorio di epitopi tumorali riconosciuti anche da cellule T CD4⁺ su antigeni associati a tumori, meglio se tumore-specifici e condivisi da numerosi istotipi tumorali (Van den Eynde, B.J., et al. 1997. *Immunol. Today* 9:684-693), contribuirebbe decisamente ad aumentare l'efficacia dei protocolli d'immunizzazione basati sull'uso di peptidi tumorali in

pazienti neoplastici.

La famiglia di geni MAGE ("Melanoma Associated Antigen") è composta da circa 12 elementi che vengono espressi in vari tipi di tumore. MAGE-3 è un antigene tumore-specifico espresso in un alto numero di melanomi e in molti altri istotipi tumorali (carcinomi della testa e del collo a cellule squamose, carcinomi della vescica, carcinomi polmonari e sarcomi) ma non in tessuti normali, con l'eccezione dei testicoli e della placenta (Van den Eynde, B.J., et al. 1997. *Immunol. Today* 9:684-693). Linfociti T citotossici CD8⁺ di pazienti con melanoma riconoscono epitopi di MAGE-3 in associazione ad HLA di classe I (Van den Eynde, B.J., et al. 1997. *Immunol. Today* 9:684-693), e sono in corso di svolgimento protocolli clinici che prevedono l'utilizzo di peptidi sintetici corrispondenti alle sequenze di MAGE-3 che legano l'HLA-A1 e/o -A2, in pazienti affetti da melanoma e da altre malattie neoplastiche (Van den Eynde, B.J., et al. 1997. *Immunol. Today* 9:684-693).

Secondo un primo aspetto, l'invenzione si riferisce a peptidi immunogenici derivati da MAGE-3 in grado di legarsi a molecole MHC di classe II. I peptidi in questione hanno una lunghezza variabile tra 12 e 15 residui e corrispondono ai frammenti di MAGE-3 (secondo la sequenza amminoacidica riportata in Gaugler B. et al. 1994, *J. Exp. Med.* 179, 921-930) 21-35, 111-125, 161-175, 191-205, 251-265, 286-300, preferibilmente 141-155, 146-160, 156-170, 171-185, ancora più preferibilmente 281-295. Le sequenze amminoacidiche corrispondenti sono riportate in SEQ ID No. 1-11.

I peptidi dell'invenzione sono caratterizzati dalla promiscuità di legame a diversi alleli di molecole MHC di classe II, caratteristica vantaggiosa poiché consente ad uno stesso peptide di essere riconosciuto da una popolazione di

pazienti piu' vasta.

In un saggio di legame *in vitro* i peptidi si sono dimostrati in grado di legare diverse molecole purificate appartenenti ad alleli HLA-DR ampiamente diffusi, e di indurre attivazione delle cellule CD4⁺. In particolare, si è visto che in risposta alla stimolazione coi peptidi dell'invenzione, si ha una notevole induzione della proliferazione di cellule T CD4⁺ e della loro attività citolitica. Le cellule T CD4⁺ esposte ai peptidi si sono dimostrate in grado di lisare cellule di melanoma esprimenti la proteina MAGE-3 e molecole HLA-DR. I dettagli di queste evidenze sperimentali sono riportati negli esempi.

I peptidi sono preferibilmente preparati per via sintetica, per esempio secondo le procedure descritte in Merrifield, (1986) *Science* 232:341-347, e Barany e Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meienhofer, eds (N.Y., Academic Press), pp. 1-284 (1979). La sintesi può essere condotta in soluzione o in fase solida o con un sintetizzatore automatizzato (Stewart e Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., Rockford Ill., Pierce Chemical Co. (1984). In alternativa può essere utilizzata la tecnologia del DNA ricombinante o ancora i peptidi possono essere preparati a partire dalla proteina naturale per frammentazione o digestione enzimatica. Inoltre, uno o più residui amminoacidici possono essere sostituiti, preferibilmente in maniera conservativa, con altri residui di L- o D- amminoacidi, o aggiunti ai peptidi descritti, oppure possono essere modificati chimicamente, ad esempio mediante ammidazione del gruppo carbossilico terminale o mediante legame con gruppi lipofili (ad es. miristile) oppure mediante glicosilazione, o coniugazioni con altri peptidi, in modo da ottenere proprietà più favorevoli, come maggiore affinità per la molecola MHC, maggiore immunogenicità, maggiore selettività



d'induzione della risposta immunitaria o maggiore biodisponibilità dopo somministrazione. I peptidi dell'invenzione possono anche essere derivatizzati chimicamente a livello delle catene laterali che risultano quindi modificate. Per esempio gruppi carbossilici liberi possono essere derivatizzati a formare sali, metil- ed etil- esteri o altri tipi di esteri o idrazidi.

I peptidi dell'invenzione possono anche essere coniugati ad altri epitopi noti, ad esempio leganti la classe HLA I, al fine di indurre uno spettro di risposte piu' complete, sia citotossiche che "helper", ed aumentando la risposta complessiva contro il tumore.

La possibilità di disporre di epitopi derivati da un antigene non significativamente espresso in tessuti normali, quale MAGE-3, ha notevoli risvolti pratici in quanto consente la preparazione di vaccini da usare nell'immunoterapia di soggetti con tumori esprimenti lo stesso antigene. Inoltre, il fatto che tali epitopi inducano una risposta cellulare mediata da linfociti T CD4⁺ permette il potenziamento della risposta stessa in quanto tali linfociti, oltre ad una attività citotossica intrinseca, possiedono anche un'attività "helper", che condiziona la stimolazione e la proliferazione di altri tipi linfocitari, per esempio linfociti T CD8⁺, e l'attivazione dei macrofagi.

Pertanto, secondo un altro aspetto, l'invenzione fornisce composizioni farmaceutiche contenenti una quantità efficace di un peptide qui descritto, eventualmente in combinazione con altri peptidi noti che legano molecole MHC di classe I e che corrispondono a epitopi per cellule T CD8⁺, come i peptidi descritti in WO95/19783. Oltre allo/agli ingredienti attivi, le composizioni conterranno eccipienti farmaceuticamente accettabili. Per "quantità efficace" si intende una quantità sufficiente ad attivare i linfociti specifici ed a scatenare

una risposta efficace contro il tumore. Tale quantità dipenderà dal peptide utilizzato, dalla via e modalità di somministrazione, dalla gravità della patologia da trattare e dalle condizioni generali del paziente e in generale sarà compresa tra 1-50 µg/ml, ad esempio nel caso di caricamento dei peptidi su cellule dendritiche.

Secondo una realizzazione preferita, dette composizioni saranno indicate per la vaccinazione preventiva di pazienti a rischio di sviluppo di neoplasie o nella vaccinazione terapeutica di pazienti neoplastici. Il termine vaccinazione si riferisce in questo contesto, sia alla vaccinazione attiva, cioè' alla somministrazione dei peptidi *in vivo* con l'attivazione di una risposta immunitaria *in vivo*, direttamente nel paziente, come avviene classicamente nei protocolli di vaccinazione ad esempio contro agenti patogeni, che alla vaccinazione passiva, cioè' all'utilizzo dei peptidi per l'attivazione *in vitro* di cellule CD4⁺ anti-tumore, con il loro successivo re-inoculo nel paziente.

Le tecniche di preparazione ed uso dei vaccini sono note all'esperto del settore e sono descritte, per esempio, in Paul, *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York (1989) o Cryz, S. J., *Immunotherapy and Vaccines*, VCH Verlagsgesellschaft (1991). Normalmente i vaccini vengono preparati come iniettabili, sospensioni o soluzioni, ma possono essere impiegati anche in forma di preparazioni solide o a base di liposomi. Gli ingredienti immunogenici possono essere miscelati con eccipienti farmacologicamente accettabili, quali emulsificanti, agenti tamponanti, e adiuvanti che aumentano l'efficacia del vaccino. Quest'ultimo può essere dato secondo uno schema di dosaggio singolo o multiplo. Nel dosaggio multiplo vengono fornite da 1 a 10 dosi separate, ciascuna contenente una quantità di antigene variabile da 1µg a 1000µg, seguite

da altre dosi a intervalli di tempo successivi, necessarie per mantenere o rinforzare la risposta immunitaria e, se richiesto dal soggetto, un'ulteriore dose dopo diversi mesi. In ogni caso, il regime di trattamento dipenderà dalla risposta ottenuta dal paziente sotto trattamento, dalle sue condizioni generali, dallo stato d'avanzamento del tumore.

In un ulteriore aspetto, l'invenzione fornisce un metodo per indurre una risposta immunitaria verso cellule tumorali che esprimono un antigene MAGE-3 che comprende il mettere in contatto cellule APC ("Antigen Presenting Cells") con i peptidi dell'invenzione in condizioni idonee all'attivazione di cellule T CD4⁺ effettrici.

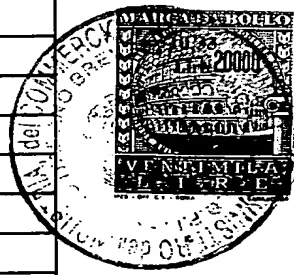
Tali condizioni comprendono il caricamento delle APC autologhe con i peptidi e la successiva esposizione ai linfociti CD4⁺ purificati. Cellule APC adatte allo scopo sono costituite da cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) autologhe, oppure cellule dendritiche, macrofagi e cellule B attivate. Ad una coltura di APC viene aggiunto il/i peptide/i per un tempo sufficiente ad ottenere il legame peptide/APC, e successivamente viene aggiunta una popolazione cellulare contenente CTL CD4⁺ che vengono così attivati e proliferano. Secondo una realizzazione preferita, i linfociti T sono prelevati dal paziente sotto trattamento ed eventualmente purificati, quindi dopo attivazione ottenuta come descritto, ed espansione in opportuni terreni di coltura, reintrodotti nello stesso. I terreni di coltura possono contenere una o più citochine (quali ad es. IL-2 o T-cell Growth Factor) che contribuiscono all'espansione dei precursori CD4⁺.

In una realizzazione preferita, le cellule importanti per l'induzione della risposta immunitaria, quali APC, cellule dendritiche etc., sono ingegnerizzate

con vettori codificanti per i peptidi descritti nella presente invenzione (ad esempio vettori virali o retrovirali, quali quelli derivati da adenovirus o da lentivirus o da MLV), che possono essere anche sotto forma di proteine di fusione con un carrier adatto, per essere espressi in modo efficiente nella cellula, e quindi processati ed esposti sulla superficie cellulare. In tale caso il DNA codificante per gli epitopi descritti nella presente invenzione, potrà essere inserito nel vettore di espressione idoneo, sotto controllo di un opportuno promotore virale, quale il CMV, SV40, nel caso sia richiesta un'espressione molto efficiente, oppure inducibile quale quello controllato da ecdisone. In questo caso gli epitopi descritti possono essere rappresentati dai frammenti nucleotidici indicati nella seguente tabella 1, che fanno riferimento alla numerazione del gene di MAGE-3 (umano) depositata in GenBank con il numero di accesso U03735:

TABELLA 1

aa	Sequenza amminoacidica	Nt
21-35	EALGLVGAQAPATEE	2525-2569
111-125	RKVAELVHFLLLKYR	2795-2839
141-155	GNWQYFFPVIFSKAS	2885-2929
146-160	FFPVIFSKASSSLQL	2900-2944
156-170	SSLQLVFGIELMEVD	2930-2974
161-175	VFGIELMEVDPIGHL	2945-2989
171-185	PIGHLIYIFATCLGLS	2975-3019
191-205	GDNQIMPKAGLLIIV	3035-3079
251-265	VQENYLEYRQPVGSD	3215-3259
281-295	TSYVKVLHHMVKISG	3305-3349
286-300	VLHHMVKISGGPHIS	3320-3364



L'invenzione si riferisce anche ad anticorpi, loro frammenti o derivati, diretti contro i peptidi sopra descritti. La metodologia generale per produrre

anticorpi è ben nota ed è descritta per esempio in Kohler e Milstein, 1975, *Nature* 256, 494 oppure in J.G.R. Hurrel, *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL (1982). Gli anticorpi possono essere monoclonali o policlonali, preferibilmente monoclonali, e i loro frammenti possono essere F(ab')₂, Fab, Fv o scFv.

Un ultimo aspetto dell'invenzione riguarda un metodo per monitorare mediante tecnica ELISPOT (Herr, W. Et al., 1997, *J. Immunol. Methods* 203:141-52) o mediante l'utilizzo di tetrameri costituiti da molecole solubili tetrameriche avidina-biotina-MHC di classe II, pulsate con il peptide rilevante (Yee, C. et al. 1999, *J. Immunol.* 162:2227-2234), mediante analisi citofluorimetrica, la frequenza e l'espansione di precursori specifici per i peptidi o la proteina MAGE-3 intera, in pazienti neoplastici, sottoposti a vaccinazione attiva.

Descrizione delle Figure

Fig. 1: Attività proliferativa di cellule T CD4⁺ stimulate con il pool MAGE-3 misurata in saggi di microproliferazione 2-d.

I dati sono rappresentativi di (n=x) esperimenti e sono medie di determinazioni in triplicato \pm SD. Pannello A (n=6): risposte al pool MAGE-3 (0,01, 0,5, 0,1, 0,5, 1 e 5 μ g/ml). Pannello B (n=3): risposte alla proteina MAGE-3 ricombinante (5, 10 e 20 μ g/ml). Pannello C (n=7): risposte ai singoli peptidi sintetici che formano il pool MAGE-3 (10 μ g/ml) a varie settimane di propagazione. Il bianco (cioè il livello basale di proliferazione delle cellule T CD4⁺ in presenza di sole APC) è stato sottratto ed era il seguente: a 2 settimane: 30,866 \pm 1,115; a 4 settimane: 7,106 \pm 2,201; e a 6 settimane: 21,838 \pm 2,767. Gli asterischi indicano le risposte significativamente superiori ai bianchi (*, P<0,001 e * P<0,025, come determinato attraverso il test t di Student non

accoppiato ad una coda). Pannello D (n=5): risposta al pool di MAGE-3 (5 µg/ml) (a) e al peptide corrispondente alla sequenza 281-295 (b), in presenza di varie dosi dell'anticorpo monoclonale L243 (0,25 e 0,5 µg/ml). Il bianco era $1,251 \pm 444$, la proliferazione di cellule T CD4⁺ in presenza del pool di MAGE-3 era $28,191 \pm 373$, e la proliferazione in presenza della sequenza 281-295 era $22,504 \pm 141$.

Fig. 2: Attività citolitica di cellule T CD4⁺ specifiche per MAGE-3.

I dati sono rappresentativi di (n=x) esperimenti, e sono medie di determinazioni in triplicato \pm SD. Pannello A (n=6): attività litica contro varie cellule di melanoma esprimenti l'allele di restrizione HLA-DR o con HLA-DR non correlato. Le molecole HLA-DR espresse da cellule T CD4⁺ e dalle cellule di melanoma sono indicati in fondo con i loro simboli. Pannello B (n=4): analisi citofluorimetrica per l'espressione di HLA-DR (superficie) e MAGE-3 (intracitoplasmatico) nelle cellule di melanoma usate come bersaglio. Gli istogrammi neri si riferiscono al campione colorato; gli istogrammi bianchi si riferiscono alla colorazione di controllo ottenuta solo con il secondo anticorpo coniugato con FITC.

Fig. 3: Cellule T CD4⁺ riconoscono MAGE-3₂₈₁₋₂₉₅ in associazione con HLA-DR11 su cellule OI TC.

I dati sono rappresentativi di (n=x) esperimenti e sono medie di determinazioni in triplicato \pm SD. Pannello A (n=3): attività litica di CTL CD4⁺ contro linee cellulari linfoblastoidi umane (LCL) sole o pulsate con MAGE-3₁₄₁₋₁₅₅, MAGE-3₁₄₆₋₁₆₀ e MAGE-3₂₈₁₋₂₉₅. Pannello B (n=3): esperimenti di inibizione con bersaglio freddo. Bersagli freddi [OI TC (cerchi) e LCL pulsate con MAGE-3₂₈₁₋₂₉₅ (riquadri)] sono stati usati per inibire l'attività litica di CTL

CD4⁺ specifici per MAGE-3 contro OI TC caldo (il rapporto E/T era 40:1). La percentuale di lisi specifica contro cellule OI TC in assenza di bersagli freddi era 26±1,2%. Per le abbreviazioni dei fenotipi HLA e delle linee cellulari vedere l'Esempio 4.

Gli esempi che seguono illustrano l'invenzione in maggior dettaglio.

ESEMPI

Esempio 1

Saggio di legame peptide-DR

Le interazioni dei peptidi con molecole DR solubilizzate con detergente sono state misurate usando un saggio di legame in competizione basato su ELISA (Radrizzani, L., et al. 1997. *J. Immunol.* 159:703-711). Le molecole HLA-DR, sono state isolate dalle seguenti linee cellulari linfoblastoidi umane (LCL): DR1 (DRB1*0101) da HOM-2, DR3 (DRB1*0301) da WT49, DR (DRB1*0401) da PREISS, DR5 (DRB1*1101) da SWEIG, DR7 (DRB1*0701) da EKR, e DR8 (DRB1*0801) da BM9. DR2 (DRB1*1501) è stato isolato da cellule L trasfettate (clone L466). Le molecole sono state purificate per affinità usando l'anticorpo monoclonale 1-1C4 (Cammarota, G., et al. 1992. *Nature* 356:799-801), come descritto in (Sinigaglia, F., et al. 1992. *Methods Enzymol.* 203:370-386). E' stato condotto il saggio di competizione del peptide misurando la capacità di peptidi non-marcati di competere con il peptide indicatore biotinilato per il legame a molecole DR purificate. I seguenti peptidi indicatori biotinilati sono stati usati: GFKA₇ per DR1 e DR7; GIRA₂YA₄ per DR2; LAYDA₅ per DR3; UD4 per DR4 (Hammer, J., et al. 1995. *J. Exp. Med.* 181:1847-1855); TT 830-834 per DR5; e GYRA₆L per DR8. Il peptide indicatore biotinilato e le molecole HLA-DR sono state incubate con diluizioni

di 10 volte (0,001-100 mM) dei peptidi competitori non marcati (peptidi corrispondenti alle sequenze precedentemente descritte di MAGE-3). Per determinare l'affinità di legame del peptide, in ciascun saggio di competizione è stato aggiunto il peptide HA₃₀₇₋₃₁₉ promiscuo derivato dall'emoagglutinina del virus dell'influenza (Roche, P.A., et al. 1990. *J. Immunol.* 144:1849-1856). I dati del legame relativo dei peptidi utilizzati come competitori (non marcati) sono stati espressi come IC₅₀, cioè come la concentrazione di peptide competitore richiesta per inibire del 50% il legame del peptide indicatore biotinilato.

I risultati del saggio di legame sono riportati nella seguente Tabella 2.



Tabella 2: Determinazione del legame di HLA-DR da parte dei peptidi derivati da MAGE-3

Alleli HLA-DR

Residui	Sequenza	*0101	*0301	*0401	*0701	*0801	*1101	*1501
141-155	GNWQYFFPVIISKAS	25	>100 ^(A)	7	0,1	3,2	0,6	3
146-160	FFPVIISKASSLQL	10	7	2	0,01	1,5	1,8	0,2
156-170	SSLQLVFGIELMEVD	7	90	45	0,03	7	28	0,18
171-185	PIGHLIYIFATCLGLS	0,3	2,8	0,9	0,01	1,5	0,9	0,03
281-295	TSYVKVLHHMVKISG	15	26	70	0,02	0,01	0,03	0,5

Tabella 2 -continuazione

Alleli HLA-DR									
Residues	Sequence	*0101	*0301	*0401	*0701	*0801	*1101	*1501	
21-35	EALGLVGAQAPATEE	14	>100	>100	25	>100	>100	22	
111-125	RKVAELVHFLLLKYR	>100	>100	>100	55	7	0.7	0.055	
161-175	VFGIELMEVDPIGHL ₇	>100	0.6	28	10	100	>100	100	
191-205	GDNQIMPKAGLLIIV	>100	>100	>100	6	1	4	0.07	
251-265	VQENYLEYRQVPGSD	>100	>100	>100	26	10	60	5	
286-300	VLHHMVKISGGPHIS	15	>100	>100	0.01	14	0.2	0.48	

I dati di legame sono espressi in termini di capacità di legame relativa (IC_{50} μ M), calcolati come concentrazione di peptide competitore richiesta per inibire il 50% del legame di un peptide biotinilato allele specifico (peptide indicatore). ^(a) valori di IC_{50} maggiori di 100 μ M sono al di fuori dei limiti di sensibilità del saggio di legame.

Esempio 2

Sintesi dei peptidi

I peptidi sono stati sintetizzati con un sintetizzatore Millipore 9050 (Millipore Volketswil, Svizzera). La purezza dei peptidi è stata valutata con RP-HPLC e spettrometria di massa con spray elettronico. I peptidi sintetici sono stati liofilizzati e successivamente sciolti in DMSO ad una concentrazione di 2 mg/ml e diluiti in PBS all'occorrenza.

Esempio 3

Propagazione di cellule T CD4⁺ e saggio di proliferazione

I peptidi sintetici maggiormente promiscui per il legame HLA-DR (Tabella 1 e 2) sono stati raggruppati (Pool MAGE-3) e usati per stimolare PBMC di un donatore sano avente il seguente tipo di HLA, identificato per tipizzazione sierologica standard: A1, A2/B41, B52/DR11, come descritto in Protti, M.P., et al. 1990. *J. Immunol.* 144:1711-1720. Brevemente, 20×10^6 PBMC sono state coltivate per 7 giorni in RPMI 1460 (GIBCO, Grand Island, NY), addizionato di siero umano disattivato al calore al 10% (Technogenetics, Milano, Italia), 2 mM 1-glutammina, 100 U/ml penicillina, 50 µg/ml streptomina (Biowhittaker, Walkersville, MD) (TCM) contenente il Pool MAGE-3 (1 µg/ml di ciascun peptide). I linfoblasti reattivi sono stati isolati su un gradiente Percoll (Protti, M.P., et al. 1990. *J. Immunol.* 144:1711-1720), ulteriormente espansi in fattore di crescita di cellule T (Lymphocult, Biotest Diagnostic Inc., Dreieich, Germania) e ristimolati a intervalli settimanali con la stessa quantità di antigene più PMBC autologhe irradiate (4000 rad) come APC.

Nel saggio di proliferazione cellule T CD4⁺ e PBMC autologhi irradiati sono stati diluiti in TCM a 2×10^5 /ml e in 2×10^6 /ml rispettivamente, e piastrati in

triplo in piastre da 96 pozzetti con fondo a U (100 μ l di cellule T CD4⁺ e 100 μ l di APC). Le cellule sono state stimulate con varie concentrazioni del pool MAGE-3 (0,05, 0,1, 1 e 5 μ g/ml), di ciascun peptide (10 μ g/ml) e varie concentrazioni di proteina ricombinante MAGE-3 (5, 10 e 20 μ g/ml). Come controlli sono stati usati pozzetti in triplicato con sole cellule T CD4⁺ e sole APC. Tre pozzetti con cellule T CD4⁺ più APC non hanno ricevuto alcuno stimolo per determinare il grado di crescita basale (bianco). Negli esperimenti di inibizione varie concentrazioni di anticorpo monoclonale L243 o di un anticorpo monoclonale ininfluenza (0,25 e 0,5 mg/ml) sono stati aggiunti in pozzetti in triplicato di cellule T CD4⁺ più APC stimulate con il Pool MAGE-3 (5 μ g/ml) o MAGE-3₂₈₁₋₂₉₅ (10 μ g/ml). Dopo tre giorni le colture sono state pulsate per 16 ore con [³H]TdR (1 mCi, pozzetto, 6,7 Ci/mol, Amersham Corporation, Milano, Italia). Le cellule sono state raccolte con un raccoglitore multiplo Skatron Titertek (Skatron Inc., Sterling, VA) e la timidina incorporata è stata misurata in un contatore a scintillazione liquida.

Le cellule T erano CD4⁺ per il 94% dopo una settimana di coltura, e potevano essere propagate in coltura a lungo termine per ristimolazione settimanale con il pool MAGE-3 in presenza di PBLMC irradiati autologhi. Nei saggi di microproliferazione (Fig. 1) si è visto che le cellule rispondevano fortemente al pool MAGE-3 (pannello A), persino a basse concentrazioni (100-500 ng/ml). E' stata anche esaminata la reattività ai singoli peptidi che componevano il pool (pannello C): le cellule T CD4⁺ prevalentemente riconoscevano il peptide corrispondente a MAGE-3₂₈₁₋₂₉₅ e, anche se in misura minore, i peptidi corrispondenti alle sequenze sovrapposte MAGE-3₁₄₁₋₁₅₅ e MAGE-3₁₄₆₋₁₆₀. La reattività verso MAGE-3₂₈₁₋₂₉₅ aumentava durante la



propagazione della linea (pannello C). L'attività proliferativa delle cellule T CD4⁺ in presenza del pool MAGE-3 (pannello Da) o di MAGE-3₂₈₁₋₂₉₅ (pannello Db) veniva inibita dall'aggiunta in coltura di varie concentrazioni dell'anticorpo monoclonale L243 (pannello D), dimostrando che il riconoscimento delle sequenze di MAGE-3 avveniva nel contesto di molecole HLA-DR.

Esempio 4

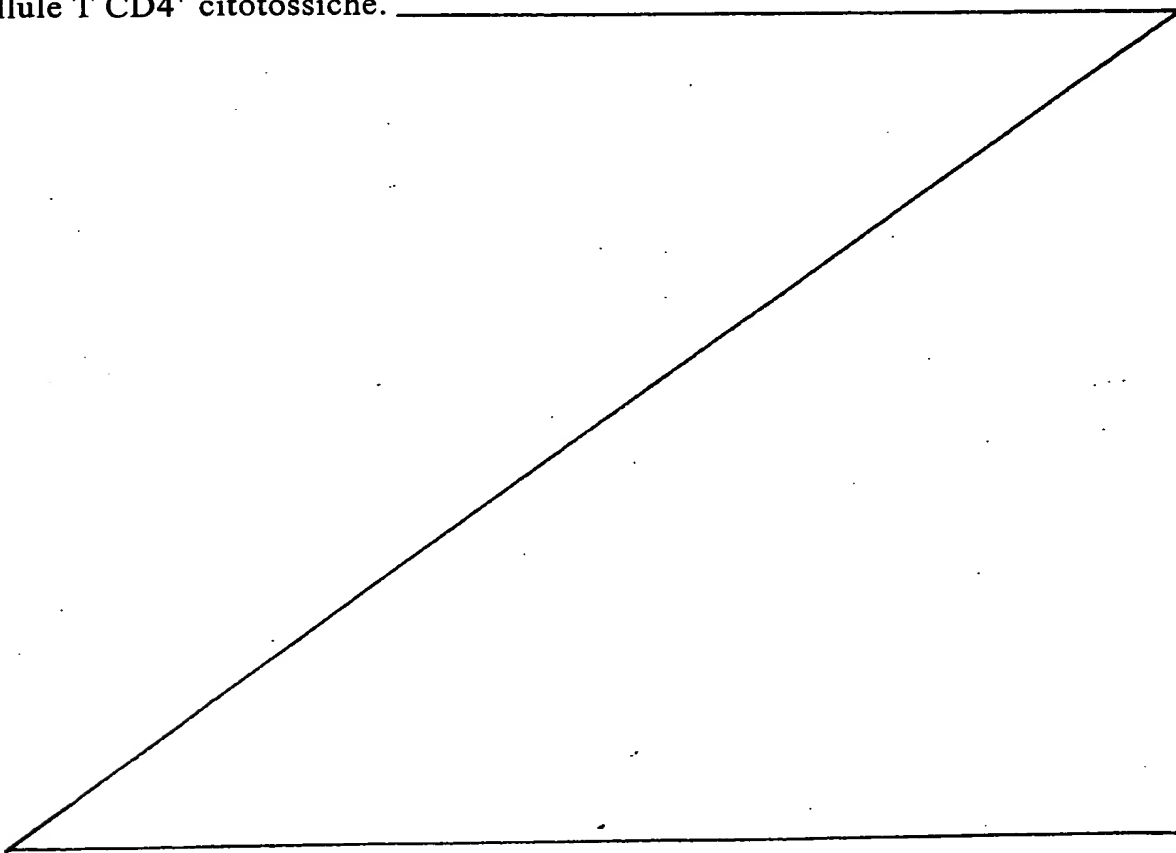
Saggio di citotossicità

Cellule T CD4⁺ sono state esaminate per attività litica specifica in un saggio standard di rilascio di ⁵¹Cr di 4 ore, come descritto in Protti, M.P., et al. 1996. *Cancer Res.* 56:1210-1213. Sono stati usati i seguenti bersagli: cellule di melanoma (SK-Mel 28, HT144, OI TC descritte in Imro, M.A., et al. 1998. *Hum. Gene Ther.* 9:1335-1344 e MD TC ottenute nel nostro laboratorio a partire da metastasi cutanee) e LCL. Il fenotipo HLA-DR delle cellule bersaglio, identificato per tipizzazione sierologica o molecolare, era: SK-Mel 28 (DR*04*13), HT144 (DR*04*07), OI TC (DR*01*11), MD TC (DR*04*11), LCL (DR11). Nei saggi di competizione con bersaglio freddo, cellule bersaglio non marcate (bersaglio freddo) sono state seminate nelle piastre a rapporti seriali di cellule bersaglio caldo/freddo. Le cellule T CD4⁺ effettrici e le cellule bersaglio marcate con ⁵¹Cr (bersaglio caldo) sono state quindi aggiunte e la citotossicità valutata come descritto sopra. La percentuale di inibizione è stata calcolata come segue:

$$[(\% \text{ di lisi specifica senza bersaglio freddo} - \% \text{ di lisi specifica con bersaglio freddo}) / (\% \text{ di lisi specifica senza bersaglio freddo})] \times 100.$$

Le cellule T CD4⁺ mostravano attività citolitica contro OI TC e LD TC che esprimono l'allele HLA-DR11, non contro SK-Mel 28 e HT144 che esprimono

alleli HLA-DR non correlati (Fig. 2a). Per verificare se le cellule T CD4⁺ citolitiche riconoscono epitopi di MAGE-3 in associazione all' HLA-DR11 su cellule di melanoma, dapprima è stata esaminata la loro attività litica contro LCL HLA-DR11⁺ non pulsate, o pulsate con i peptidi sintetici riconosciuti nei saggi di microproliferazione. Le LCL pulsate con MAGE-3₂₈₁₋₂₉₅ venivano fortemente riconosciute dalle cellule T CD4⁺, mentre non era osservabile attività litica contro LCL non pulsate o pulsate con MAGE-3₁₄₁₋₁₅₅ e MAGE-3₁₄₆₋₁₆₀ (Fig. 3a). Successivamente sono stati condotti esperimenti di inibizione del bersaglio freddo che hanno dimostrato che l'attività litica di cellule T CD4⁺ contro OI TC veniva inibita dall'aggiunta di LCL pulsato con MAGE-3₂₈₁₋₂₉₅ (Fig. 3b), dimostrando che questa sequenza viene effettivamente presentata da HLA-DR11 su cellule di melanoma OI TC. Questi risultati dimostrano inoltre che MAGE-3₂₈₁₋₂₉₅ viene processata in maniera naturale e forma un epitopo per cellule T CD4⁺ citotossiche.



LISTA DI SEQUENZA

(1) INFORMAZIONI GENERALI:

(i) RICHIEDENTE

(A) NOME: FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL MONTE
TABOR

(B) VIA: Via Olgettina, 58

(C) CITTA': Milano

(E) PAESE:

(F) CODICE DI AVVIAMENTO POSTALE (C.A.P.): 20132

(ii) TITOLO DELL'INVENZIONE: PEPTIDI IMMUNOGENICI DERIVATI
DA MAGE-3 PRESENTATI DA MHC DI CLASSE II E LORO USO

(iii) NUMERO DI SEQUENZE: 11

(iv) FORMA LEGGIBILE AL COMPUTER:

(A) TIPO DI SUPPORTO: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatibile

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMMA: PatentIn Release #1.0, Versione #1.30 (EPO)

(2) INFORMAZIONI PER SEQ ID NO: 1:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 15 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(C) TIPO DI FILAMENTO: singolo

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICO: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO DI FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA: SEQ ID NO: 1:

Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala Pro Ala Thr Glu Glu
1 5 10 15

(2) INFORMAZIONI PER SEQ ID NO: 2:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 15 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (C) TIPO DI FILAMENTO: singolo
- (D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICO: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO DI FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA: SEQ ID NO: 2:

Arg	Lys	Val	Ala	Glu	Leu	Val	His	Phe	Leu	Leu	Leu	Lys	Tyr	Arg
1				5					10					15

(2) INFORMAZIONI PER SEQ ID NO: 3:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 15 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (C) TIPO DI FILAMENTO: singolo
- (D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICO: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO DI FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA: SEQ ID NO: 3:

Gly	Asn	Trp	Gln	Tyr	Phe	Phe	Pro	Val	Ile	Phe	Ser	Lys	Ala	Ser
1				5					10					15



(2) INFORMAZIONI PER SEQ ID NO: 4:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 15 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (C) TIPO DI FILAMENTO: singolo
- (D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICO: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO DI FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA: SEQ ID NO: 4:

Phe	Phe	Pro	Val	Ile	Phe	Ser	Lys	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu
1			5				10					15		

(2) INFORMAZIONI PER SEQ ID NO: 5:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 16 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (C) TIPO DI FILAMENTO: singolo
- (D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICO: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO DI FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA: SEQ ID NO: 5:

Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Val	Phe	Gly	Ile	Glu	Leu	Met	Glu	Val	Asp	Leu
1			5				10					15			

(2) INFORMAZIONI PER SEQ ID NO: 6:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 15 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (C) TIPO DI FILAMENTO: singolo
- (D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICO: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO DI FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA: SEQ ID NO: 6:

Val	Phe	Gly	Ile	Glu	Leu	Met	Glu	Val	Asp	Pro	Ile	Gly	His	Leu
1			5				10					15		

(2) INFORMAZIONI PER SEQ ID NO: 7:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 15 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (C) TIPO DI FILAMENTO: singolo
- (D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICO: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO DI FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA: SEQ ID NO: 7:

Pro	Ile	Gly	His	Leu	Tyr	Ile	Phe	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Leu	Ser
1			5				10					15		

(2) INFORMAZIONI PER SEQ ID NO: 8:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 15 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (C) TIPO DI FILAMENTO: singolo
- (D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICO: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO DI FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA: SEQ ID NO: 8:

Gly	Asn	Asp	Gln	Ile	Met	Pro	Lys	Ala	Gly	Leu	Leu	Ile	Ile	Val
1			5				10					15		

(2) INFORMAZIONI PER SEQ ID NO: 9:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 15 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (C) TIPO DI FILAMENTO: singolo
- (D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICO: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO DI FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA: SEQ ID NO: 9:

Val	Gln	Glu	Asn	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Arg	Gln	Val	Pro	Gly	Ser	Asp
1			5				10					15		

(2) INFORMAZIONI PER SEQ ID NO: 10:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 15 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (C) TIPO DI FILAMENTO: singolo
- (D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICO: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO DI FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA: SEQ ID NO: 10:

Thr	Ser	Tyr	Val	Lys	Val	Leu	His	His	Met	Val	Lys	Ile	Ser	Gly
1				5				10					15	

(2) INFORMAZIONI PER SEQ ID NO: 11:

(i) CARATTERISTICHE DELLA SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 15 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (C) TIPO DI FILAMENTO: singolo
- (D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO DI MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICO: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO DI FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE DELLA SEQUENZA: SEQ ID NO: 11:

Val	Leu	His	His	Met	Val	Lys	Ile	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ile	Ser
1				5				10					15	



RIVENDICAZIONI

1. Peptidi che legano molecole MHC di classe II scelti dal gruppo comprendente:

- a) EALGLVGAQAPATEE
- b) RKVAELVHFLLLKYR
- c) GNWQYFFPVIFSKAS
- d) FFPVIFSKASSSLQL
- e) SSLQLVFGIELMEVD
- f) VGFIELMEVDPIGHL
- g) PIGHLYIFATCLGLS
- h) GDNQIMPKAGLLIIV
- i) VQENYLEYRQVPGSD
- j) TSYVKVLHHMVKISG
- k) VLHHMVKISGGPHIS

2. Anticorpi monoclonali o policlonali diretti contro i peptidi della rivendicazione 1.

3. Composizione farmaceutica comprendente una quantità efficace di un peptide della rivendicazione 1 insieme ad eccipienti farmaceuticamente accettabili.

4. Composizione secondo la rivendicazione 3, comprendente inoltre uno o più peptidi che legano molecole MHC di classe I e che corrispondono a epitopi CTL CD8⁺.

5. Composizione secondo le rivendicazioni 3 e 4, per uso come vaccino.

6. Metodo per indurre una risposta immunitaria verso cellule tumorali che esprimono un antigene MAGE-3 che comprende il mettere in contatto cellule

APC con i peptidi della rivendicazione 1 in condizioni idonee all'attivazione di cellule T CD4⁺ effettrici.

7. Metodo secondo la rivendicazione 6, in cui APC autologhe sono caricate dei peptidi e successivamente messe a contatto con linfociti CD4⁺ purificati.

8. Uso dei peptidi della rivendicazione 1 per la preparazione di un medicamento anti-tumorale.

9. Uso secondo la rivendicazione 8, in cui detto medicamento è un vaccino.

Milano, 26 febbraio 1999

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

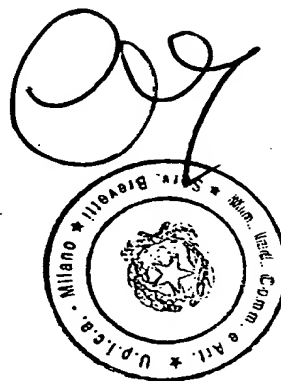
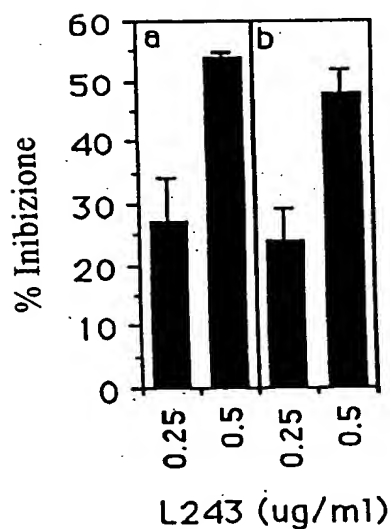
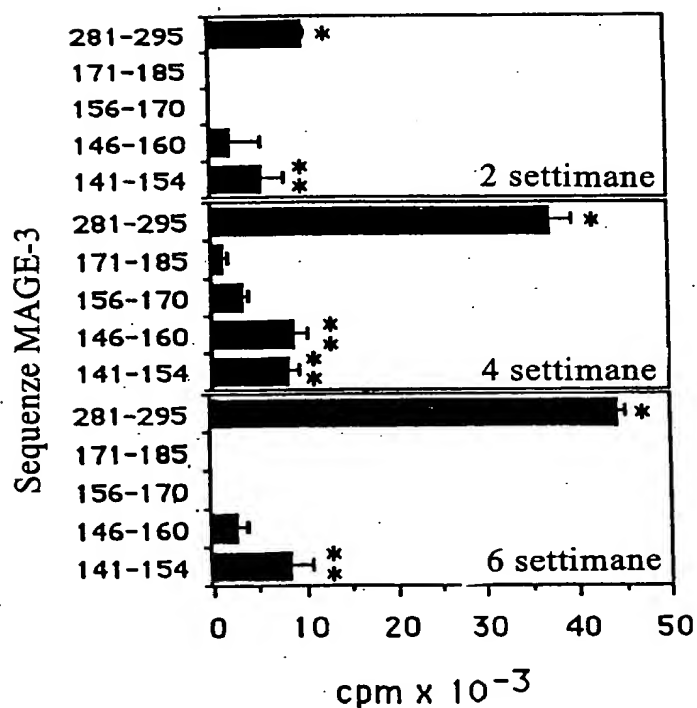
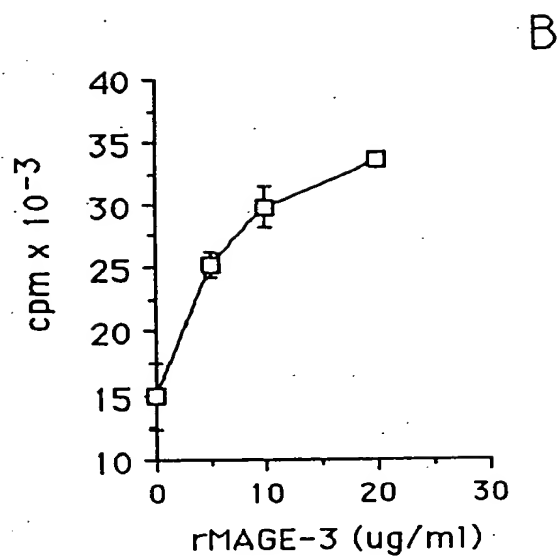
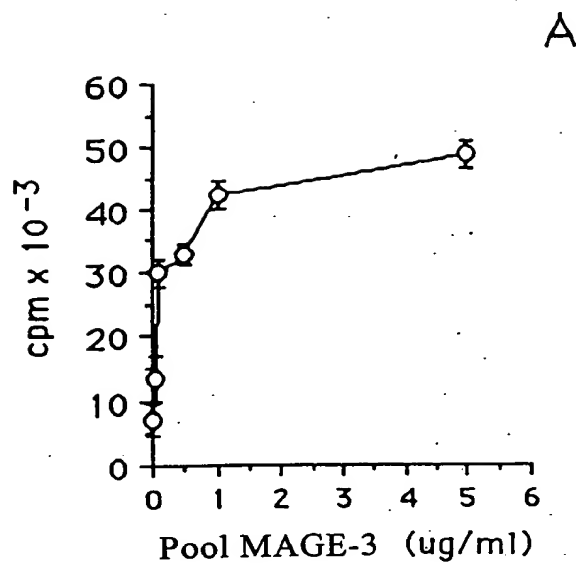


FIGURA 1

MI 99 A 000396



Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti • Bracco Minoja S.r.l.

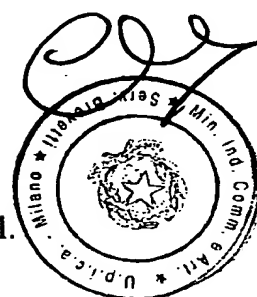
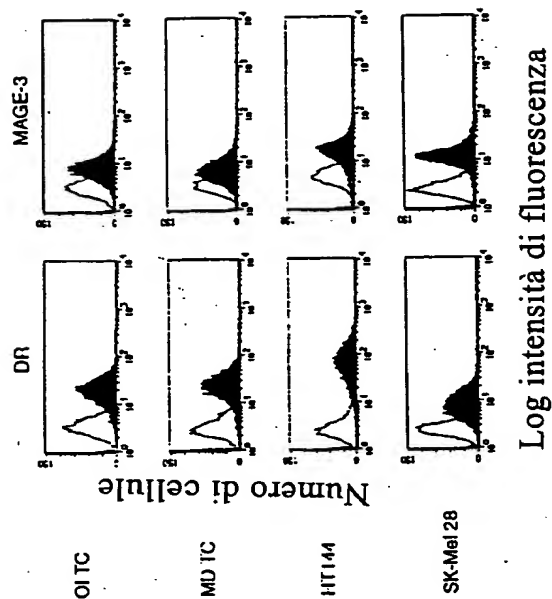
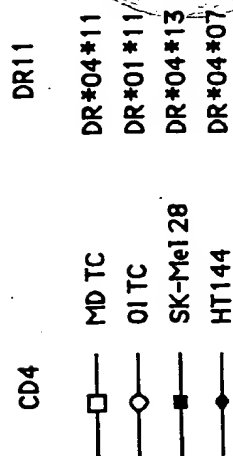
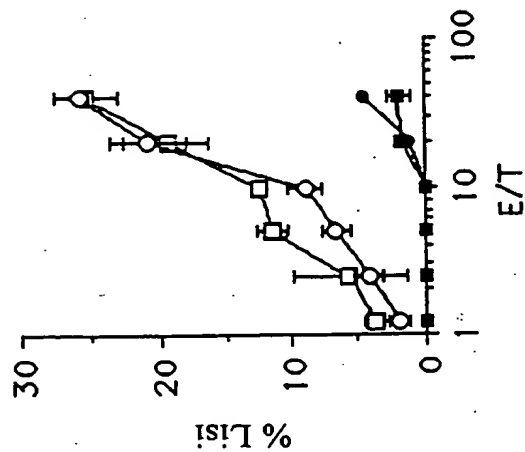


FIGURA 2

B



A



Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti • Bracco Minoja S.r.l.

Handwritten signature

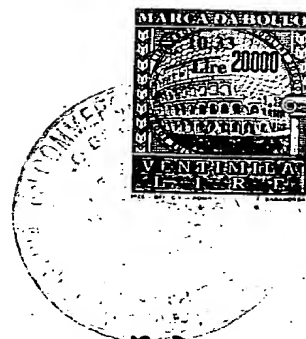
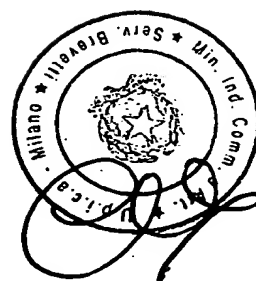
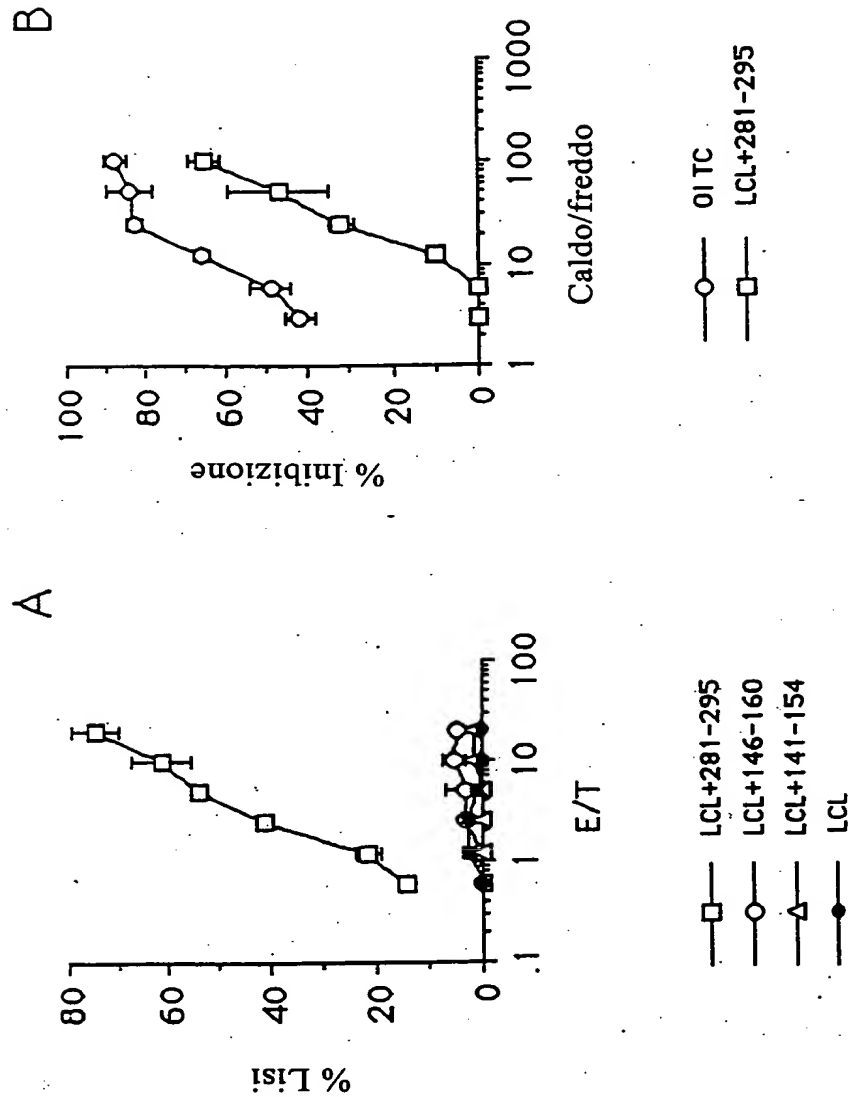


FIGURA 3

MI 99 A 000 396



Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti • Bra'cco • Minoja S.r.l.

Handwritten signature: Paolo Banfi

